



(43) 国際公開日  
2005 年 4 月 7 日 (07.04.2005)

**PCT**

(10) 国際公開番号  
**WO 2005/030958 A1**

- |   |   |  |
|---|---|--|
| (51) 国際特許分類 <sup>7</sup> :<br>9/12, 11/02, C12M 1/00, C12Q 1/68   | C12N 15/10,   | (72) 発明者; および<br>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 林崎 良英 (HAYASHIZAKI, Yoshihide) [JP/JP]; 〒3050061 茨城県つくば市稲荷前2-2-8 Ibaraki (JP). 神谷 守 (KAMIYA, Mamoru) [JP/JP]; 〒1080073 東京都港区三田一丁目3番35号 株式会社ダナフォーム内 Tokyo (JP). |
| (21) 国際出願番号:  | PCT/JP2004/014245   |  |
| (22) 国際出願日:   | 2004 年9 月29 日 (29.09.2004)  |  |
| (25) 国際出願の言語:   | 日本語   |  |
| (26) 国際公開の言語:   | 日本語   |  |
| (30) 優先権データ:  |   | (74) 代理人: 間山 世津子, 外(MAYAMA, Setsuko et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町3丁目30番の1 農機館4階 Kanagawa (JP).  |
| 特願2003-339542   | 2003 年9 月30 日 (30.09.2003) JP   |  |
| (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP). 株式会社ダナフォーム (KABUSHIKI KAISHA DNAFORM) [JP/JP]; 〒1080073 東京都港区三田一丁目3番35号 Tokyo (JP). | (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, |  |

〔続葉有〕

**(54) Title:** SUPPORT HAVING ENZYME IMMOBILIZED THEREON, PRINT, REAGENT KIT, PROCESS FOR PRODUCING THE SUPPORT, METHOD OF PRESERVING ENZYME AND METHOD OF REVITALIZING ENZYME

(54) 発明の名称: 酵素が固定されている支持体、印刷物、試薬キット、該支持体の製造法、酵素の保存法及び酵素の再生法

**(57) Abstract:** An enzyme can be preserved by a simple method. There are provided a support having an enzyme and a protective agent therefor immobilized thereon; a print and reagent kit including the support; a process for producing the support; a method of revitalizing the enzyme immobilized on the support; and a method of preserving an enzyme in the state of being immobilized on a support as a mixture with a protective agent.

(57) 要約: 酵素を簡便な方法で保存可能とする。酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体。該支持体を含む印刷物及び試薬キット。該支持体を製造する方法。該支持体に固定された酵素を再生する方法。酵素を保護剤との混合物として支持体に固定した状態で保存する方法。

Clone 1 cDNA: malate dehydrogenase  
Clone ID: 1500012M15  
DNA sequence  
.....  
.....  
.....  
.....

Clone 2 cDNA: Isocitrate dehydrogenase (NAD)  
Clone ID: 1500012E04  
DNA sequence  
.....  
.....  
.....  
.....

Clone 3 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NADP)  
Clone ID: E030024J03  
DNA sequence  
.....  
.....  
.....  
.....

Clone 4 cDNA: oxoglutarate dehydrogenase (lipoamine)  
Clone ID: E430020N12  
DNA sequence  
.....  
.....  
.....  
.....

**Procedures**  
To amplify cDNA inserts, cut out the 4 mm X 4 mm area spotted with DNA, place it into a PCR tube, add 25  $\mu$ l of water, centrifuge the resulting solution, and then initiate PCR cycle. The spot contains Taq DNA polymerase, an epimerase against the Taq DNA polymerase, trehalose, a PCR buffer, PCR primers

(-21M13:  
5'-TGTAAGACGACGGCCAGT-3', 1233-Rv5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-  
3', each of dATP, dGTP, dCTP and dTTP, and MgCl<sub>2</sub>. After centrifuging the  
resulting solution, the PCR cycle is initiated. PCR cycles comprises 2 min at 94°C,  
29 cycles of denaturing (94°C, 1 min), annealing (60°C, 1 min) and extension  
(68°C, 75 sec), and 15 min at 74°C.

Clone 1  
Clone 2  
Clone 3  
Clone 4



NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。